

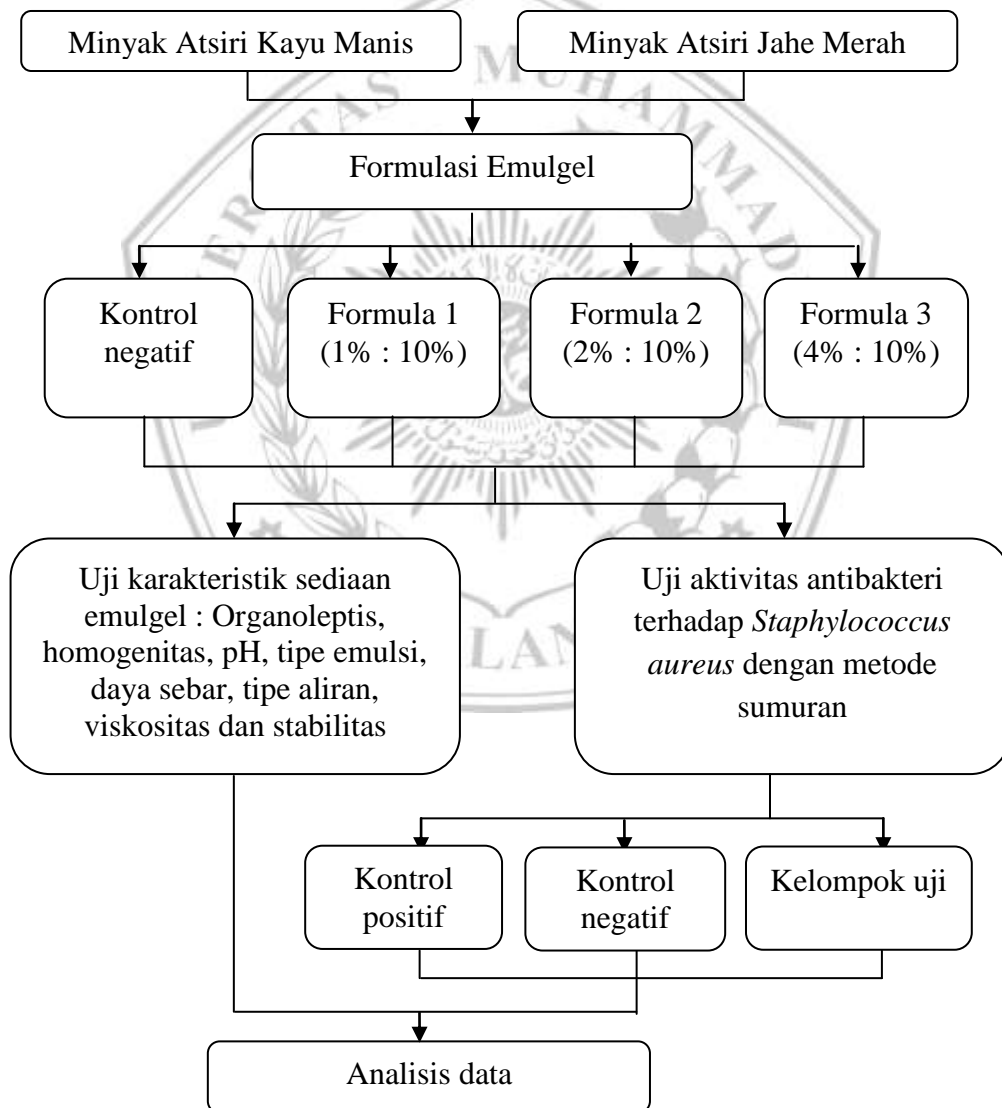
## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental untuk mengetahui pengaruh peningkatan konsentrasi minyak atsiri kayu manis yang dikombinasikan dengan minyak atsiri jahe merah dalam sediaan emulgel terhadap karakteristik sediaan emulgel dan mengetahui aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode sumuran.

##### 4.1.1 Desain Penelitian



**Gambar 4.1** Desain Penelitian Uji Karakteristik Sediaan Emulgel dan Uji Aktivitas Antibakteri

#### 4.2 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni sampai bulan September 2019. Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasetika Sediaan Farmasi Universitas Muhammadiyah Malang dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang.

#### 4.3 Variabel Penelitian

##### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah kombinasi konsentrasi zat aktif yang berbeda dari minyak atsiri kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) dan jahe merah (*Zingiber officinale* var. *Rubrum*) dalam sediaan emulgel.

##### 4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah diameter zona hambat pada media agar mueller hinton dengan metode sumuran.

#### 4.4 Definisi Operasional

1. Minyak atsiri kayu manis adalah minyak essensial yang berasal dari kulit batang tanaman kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) dan diperoleh dari Lansida.
2. Minyak atsiri jahe merah adalah minyak essensial yang berasal dari rimpang tanaman jahe (*Zingiber officinale* var. *Rubrum*) dan diperoleh dari Lansida.
3. Emulgel adalah emulsi tipe minyak dalam air dengan penambahan basis gel sebagai pembawa zat aktif yang bersifat hidrofobik.
4. Karakteristik sediaan emulgel adalah parameter yang digunakan untuk mengetahui kualitas sediaan yang meliputi organoleptis, homogenitas, pH, tipe emulsi, daya sebar, tipe aliran, viskositas, dan stabilitas.
5. Kontrol positif adalah Medi-Klin yang berisi klindamisin 1,2% digunakan sebagai perbandingan emulgel dalam menghambat *Staphylococcus aureus*.
6. Kontrol negatif adalah sediaan emulgel tanpa zat aktif minyak atsiri kayu manis dan jahe merah dengan formulasi yang tercantum pada penelitian ini dan digunakan sebagai perbandingan emulgel dalam menghambat *Staphylococcus aureus*.

## **4.5 Bahan dan Alat Penelitian**

### **4.5.1 Bahan Penelitian**

Bahan penelitian yang digunakan yaitu minyak atsiri kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) dan minyak atsiri jahe merah (*Zingiber officinale* var. *Rubrum*) yang diperoleh dari Lansida Yogyakarta.

### **4.5.2 Bakteri Uji**

Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang.

### **4.5.3 Bahan untuk Membuat Sediaan Emulgel**

Bahan yang digunakan untuk membuat sediaan emulgel yaitu karbopol (Hangzhou Linge Technology), trietanolamin (CV. Cipta Anugrah Bakti Mandiri), propilenglikol (CV. Cipta Anugrah Bakti Mandiri), polisorbit 80 (CV. Cipta Anugrah Bakti Mandiri), Sorbitan monolaurat 20 (CV Asiah Athmar Zayn), metil paraben (CV. Cipta Anugrah Bakti Mandiri), propil paraben (CV. Cipta Anugrah Bakti Mandiri), *olive oil* (Lansida), Butil Hidroksi Toluena (CV. Cipta Anugrah Bakti Mandiri), dan aquades (Medicare).

### **4.5.4 Bahan untuk Uji Daya Antibakteri**

Bahan untuk uji daya antibakteri yaitu agar mueller hinton sebagai media uji, sediaan emulgel kombinasi minyak atsiri kayu manis dan jahe merah dan Medi-Klin yang berisi klindamisin 1,2%.

### **4.5.5 Alat Penelitian**

Alat penelitian yang digunakan yaitu mortir, stamper, *beaker glass*, gelas ukur, gelas arloji, sudip, cawan porselen, batang pengaduk, pipet tetes, wadah emulgel, timbangan analitik, pH meter, viskometer, alat uji daya sebar, anak timbang, vial, *object glass*, *cover glass*, cawan petri, *Laminar Air Flow*, kulkas dan *climatic chamber*.

#### 4.6 Rancangan Formula Sediaan Emulgel

**Tabel IV.1** Rancangan Formula Sediaan Emulgel

No.	Nama Bahan	Fungsi	% Rentang	Formula (%)			
				KN	F1	F2	F3
1.	Minyak atsiri kayu manis	Zat aktif	-	-	1	2	4
2.	Minyak atsiri jahe merah	Zat aktif	-	-	10	10	10
3.	Karbopol	<i>Gelling agent</i>	0,5-2	1	1	1	1
4.	Trietanolamin	<i>Adjust pH</i>	qs	qs	qs	qs	qs
5.	Propilenglikol	Humektan	15	10	10	10	10
6.	Polisorbat 80	Emulgator	1-10	3,63	3,63	3,63	3,63
7.	Sorbitan monolaurat 20	Emulgator	1-10	4,35	4,35	4,35	4,35
8.	Metil paraben	Pengawet	0,02-0,3	0,1	0,1	0,1	0,1
9.	Propil paraben	Pengawet	0,01-0,6	0,1	0,1	0,1	0,1
10.	<i>Olive Oil</i>	Emolien	-	0,5	0,5	0,5	0,5
11.	Butil Hidroksi Toluena	Antioksidan	0,0075-0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
12.	Aquades	Pelarut	-	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

Keterangan:

KN = Kontrol Negatif = Formula tanpa zat aktif minyak atsiri

F1 = Formula dengan kadar minyak atsiri kayu manis 1 % dan jahe merah 10 %

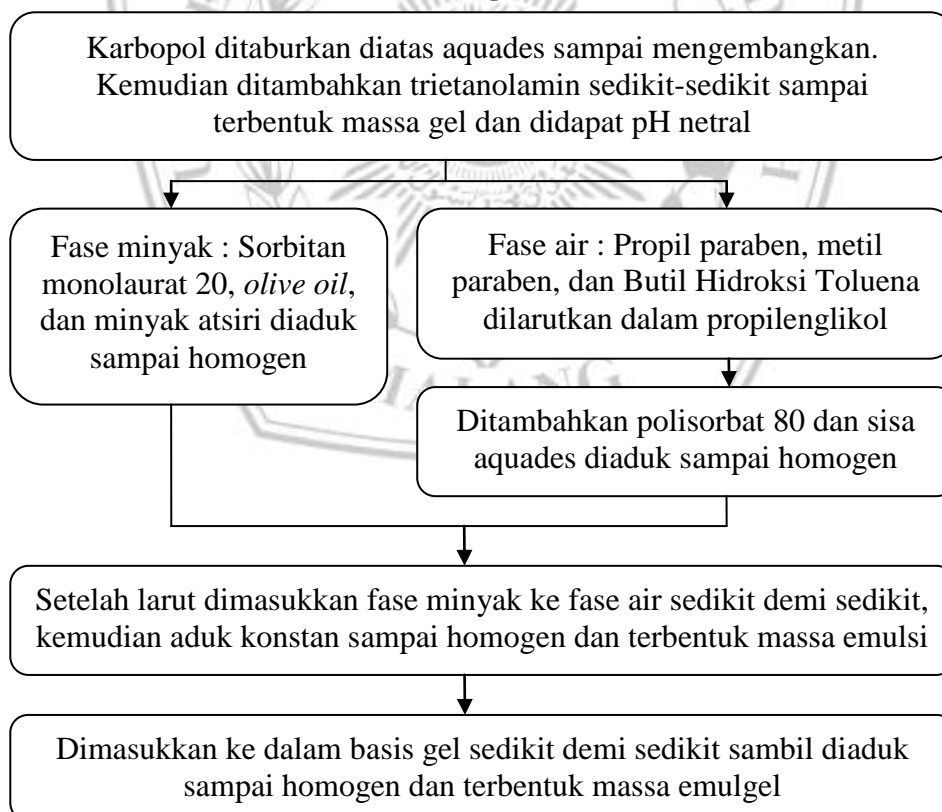
F2 = Formula dengan kadar minyak atsiri kayu manis 2 % dan jahe merah 10 %

F3 = Formula dengan kadar minyak atsiri kayu manis 4 % dan jahe merah 10 %

#### 4.7 Pembuatan Sediaan Emulgel

Dibuat basis gel dengan karbopol ditaburkan diatas aquades sampai mengembangkan dalam mortir. Kemudian ditambahkan trietanolamin sedikit demi sedikit sampai terbentuk massa gel. Diukur pH dengan pH indikator sampai didapat pH netral. Lalu dibuat emulsi dengan mencampurkan fase minyak dan fase air. Fase minyak terdiri dari sorbitan monolaurat 20, *olive oil*, minyak atsiri kayu manis dan minyak atsiri jahe merah, dimasukkan dalam cawan porselen diaduk sampai homogen. Fase air terdiri dari propil paraben, metil paraben dan Butil Hidroksi Toluena dilarutkan dalam propilenglikol dimasukkan dalam cawan porselen diaduk sampai larut. Setelah larut ditambahkan polisorbat 80 dan sisa aquades diaduk sampai homogen. Kemudian dimasukkan fase minyak ke fase air sedikit demi sedikit, kemudian aduk konstan sampai homogen dan terbentuk massa emulsi. Dimasukkan ke dalam basis gel sedikit demi sedikit sambil diaduk sampai homogen dan terbentuk massa emulgel.

#### 4.8 Skema Pembuatan Sediaan Emulgel



**Gambar 4.2** Skema Pembuatan Sediaan Emulgel

## **4.9 Uji Karakteristik Sediaan Emulgel**

### **4.9.1 Pengujian Organoleptis**

Pengujian organoleptis dilakukan untuk mengetahui warna, bau dan tekstur dari emulgel yang sudah dibuat. Pengujian ini perlu dilakukan untuk meningkatkan nilai estetika dari suatu sediaan (Pelen dkk., 2016).

### **4.9.2 Pengujian Homogenitas**

Pengujian homogenitas dilakukan untuk melihat homogenitas emulgel yang dibuat. Pengujian dilakukan dengan cara sediaan emulgel bagian atas, tengah, dan bawah yang dioleskan pada sekeping kaca. Emulgel dikatakan homogen jika tidak terdapat butiran kasar (Pelen dkk., 2016).

### **4.9.3 Pengujian pH**

Pengujian pH dilakukan untuk mengetahui keasaman dan kebasaan suatu sediaan. Idealnya sediaan topikal mempunyai pH yang sama dengan pH kulit. Hal ini dikarenakan sediaan yang terlalu asam akan menyebabkan iritasi pada kulit dan akan memberikan rasa perih, sedangkan yang terlalu basa akan membuat kulit kering dan gatal (Simon, 2012). pH sediaan emulgel harus sesuai dengan pH kulit yaitu 4,5-6,5 (Pelen dkk., 2016). Pengujian pH dilakukan dengan alat pH meter. Dikalibrasi dengan standart 4 dan 7 selanjutnya sejumlah 100 g ditimbang. Elektroda dicelupkan dalam wadah yang berisi sediaan emulgel, dibiarkan angka bergerak sampai posisi konstan (Shanti *et al.*, 2011).

### **4.9.4 Pengujian Tipe Emulsi**

Dilakukan dengan menggunakan uji kelarutan warna menggunakan zat warna larut air seperti *methylen blue* dan zat warna larut minyak seperti sudan III yang di teteskan pada permukaan emulgel. Jika *methylen blue* larut dan berdifusi homogen pada fase eksternal yang berupa air, maka tipe emulsi adalah minyak dalam air. Lalu diamati menggunakan mikroskop. Jika fase eksternal berwarna biru dan fase internal terdapat tetesan berwarna bening, maka tipe emulsi adalah minyak dalam air (Nurdianti *et al.*, 2018). Sedangkan setelah ditambahkan sudan III maka emulgel tidak bisa bercampur dan menyebar (Erwiyani dkk., 2018).

#### 4.9.5 Pengujian Daya Sebar

Pengujian daya sebar dilakukan untuk menjamin emulgel dapat tersebar ketika diaplikasikan pada kulit. Sejumlah 0,5 g emulgel diletakkan diatas kaca, kaca lainnya diletakkan diatasnya dan dibiarkan tanpa ditambah beban. Kemudian diameter daya sebar emulgel diukur menggunakan penggaris. Ditambahkan 50 g beban tambahan dan didiamkan selama 1 menit lalu diukur kembali diameternya. Kemudian ditambahkan 100 g beban dan ditunggu 1 menit lalu diukur diameter yang konstan (Naibaho *et al.*, 2013). Daya sebar 5 – 7 cm menunjukkan konsistensi semi padat yang sangat nyaman diaplikasikan pada kulit (Garg *et al.*, 2002). Apabila daya sebar terlalu kecil, maka akan relatif sulit untuk menyebar saat diaplikasikan pada kulit sedangkan apabila daya sebar terlalu besar akan cenderung cepat menyebar saat diaplikasikan sehingga akan menimbulkan rasa kurang nyaman pada pengguna (Nurdianti *et al.*, 2018).

#### 4.9.6 Pengujian Tipe Aliran dan Viskositas

Viskositas yang tinggi akan memberikan stabilitas sistem emulsi di dalam sediaan emulgel karena akan meminimalkan pergerakan droplet fase dispers sehingga perubahan ukuran droplet ke ukuran yang lebih besar dapat dihindari dan kemungkinan terjadinya koalesens dapat dicegah (Laverius, 2011). Penentuan tipe aliran emulgel dilakukan menggunakan *viscometer brookfield* spindel nomor 64. Kecepatan pengadukan ditentukan berdasarkan besarnya kecepatan yang mampu memberikan perubahan viskositas pada emulgel (0,3 rpm, 0,6 rpm, 1,5 rpm, 3 rpm, 6 rpm, 12 rpm, 30 rpm dan 60 rpm) (Kusumawati dkk., 2018). Pengukuran viskositas dilakukan dengan menggunakan alat *viscometer brookfield*. Dilakukan dengan cara mencelupkan spindle ke dalam sediaan emulgel kemudian dilihat viskositasnya (Nurdianti *et al.*, 2018). Syarat viskositas untuk sediaan emulgel yaitu 2000-50.000 cps (Erwiyani dkk., 2018).

#### 4.9.7 Pengujian Stabilitas

Uji stabilitas dilakukan untuk mengetahui kestabilan fisik sediaan selama masa penyimpanan dalam waktu tertentu terhadap perubahan suhu ekstrim. Uji ini dilakukan menggunakan metode *freeze thaw* dengan menyimpan sediaan dalam kulkas pada suhu 4°C selama 24 jam lalu dikeluarkan dan dimasukkan dalam oven pada suhu 40°C selama 24 jam. Proses ini terhitung 1 siklus dan dilakukan

sebanyak 6 siklus. Setiap satu siklus selesai diamati ada tidaknya pemisahan fase dan perubahan warna pada sediaan (Daud, 2017).

#### **4.10 Uji Aktivitas Antibakteri Emulgel**

##### **4.10.1 Peremajaan Bakteri**

Diremajakan bakteri uji di atas media Mueller Hinton Agar yang telah padat dengan cara diambil 1 ose bakteri. Kemudian bakteri di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Rusli dkk., 2016).

##### **4.10.2 Pembuatan Larutan Standart Mc Farland**

Diambil aquadest kira-kira setengah dari tabung reaksi. Kemudian tambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 % sebanyak 9950 µl dan BaCl<sub>2</sub> 1 % sebanyak 50 µl. Campuran kedua larutan dalam tabung tersebut, *vortex* selama 10 detik sampai homogen dan terbentuk larutan keruh. Kekeruhan ini dipakai sebagai suspensi bakteri dengan tingkat kekeruhan 1,5 x 10<sup>8</sup> CFU/ml (Hafsan *et al.*, 2015).

##### **4.10.3 Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus***

Pembuatan biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* diambil 1 ose menggunakan ose yang telah disterilkan kemudian ditanam dalam aquades, media cair *vortex* selama 10 menit lalu dibandingkan dengan standar Mc Farland 1,5 x 10<sup>8</sup> CFU/ml (Hafsan *et al.*, 2015).

Dilakukan pengenceran dengan cara diambil 1 ml dari tabung A kemudian ditambahkan aquades sampai 10 ml (tabung B), diperoleh jumlah koloni bakteri 1,5 x 10<sup>7</sup>. Kemudian diambil 1 ml dari tabung B lalu ditambahkan MHB sampai 10 ml (tabung C) sehingga diperoleh jumlah koloni bakteri 1,5 x 10<sup>6</sup> (Hafsan *et al.*, 2015).

##### **4.10.4 Pembuatan Media Mueller-Hinton Agar (MHA)**

Media agar Mueller Hinton ditimbang sebanyak 38 gram dilarutkan dalam aquadest steril sebanyak 1 L dengan cara dididihkan. Setelah larut, disteril dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. kemudian ditunggu media cair sampai suhu 40°C (Dewi, 2015).

##### **4.10.5 Uji Daya Hambat Bakteri**

Media agar Mueller Hinton dalam kondisi hangat sebanyak 20 ml dituang ke dalam cawan petri steril yang telah berisi ± 1 ml suspensi bakteri, campuran dihomogenkan dengan cara digoyangkan. Ditutup lalu dibiarkan sampai memadat



di suhu ruangan  $\pm 10$  menit (Dewi, 2015). Dibuat lubang sumuran pada cawan. Diberi label pada masing-masing lubang sumuran dengan masing-masing konsentrasinya. Setelah diberi label, dimasukkan sediaan emulgel sebanyak 0,5 g ke dalam lubang sumuran. Kemudian cawan diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37 °C. Setelah itu diukur diameter zona hambat di sekitar sumuran menggunakan jangka sorong dengan cara mengukur secara horizontal dan vertikal (Pelen dkk., 2016).

#### 4.11 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisa secara statistik menggunakan *software SPSS* (*Statistical Product and Service Solution*). Analisis data pada pemeriksaan pH, daya sebar sediaan emulgel serta uji antibakteri digunakan metode *one way anova*, pada uji tipe aliran dan viskositas menggunakan metode *two way anova* untuk melihat perbedaan dari masing-masing kelompok perlakuan dengan taraf kepercayaan 95% atau  $\alpha = 0,05$ . Sedangkan pemeriksaan karakteristik sediaan yang meliputi organoleptis, homogenitas, tipe emulsi dan stabilitas dilakukan secara deskriptif. Untuk mengetahui formula mana yang terdapat perbedaan yang bermakna dapat dilihat dari nilai P signifikansi. Apabila P signifikansi yang didapat lebih besar dari derajat kemaknaan 0,05 maka tidak ada perbedaan yang bermakna, dan sebaliknya jika nilai P signifikansi lebih kecil dari derajat kemaknaan 0,05 maka menunjukkan ada perbedaan yang bermakna. Dilanjutkan dengan uji Tukey HSD (*Honestly Significant Difference*) untuk mengetahui formula mana yang menghasilkan data berbeda.

##### 1. Karakteristik Sediaan Emulgel

$H_0$  = Tidak ada perbedaan karakteristik yang signifikan pada sediaan emulgel kombinasi minyak atsiri kayu manis dan jahe merah dengan konsentrasi (1% : 10%), (2% : 10%), dan (4% : 10%)

$H_1$  = Terdapat perbedaan karakteristik yang signifikan pada sediaan emulgel kombinasi minyak atsiri kayu manis dan jahe merah dengan konsentrasi (1% : 10%), (2% : 10%), dan (4% : 10%)

2. Diameter Zona Hambat Antibakteri

$H_0$  = Tidak ada perbedaan diameter zona hambat yang signifikan pada sediaan emulgel kombinasi minyak atsiri kayu manis dan jahe merah dengan konsentrasi (1% : 10%), (2% : 10%), dan (4% : 10%)

$H_1$  = Terdapat perbedaan diameter zona hambat yang signifikan pada sediaan emulgel kombinasi minyak atsiri kayu manis dan jahe merah dengan konsentrasi (1% : 10%), (2% : 10%), dan (4% : 10%)

